

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-003785

(43)Date of publication of application : 14.01.1993

(51)Int.Cl.

C12N 9/02  
 C12N 1/21  
 C12N 15/53  
 // C12P 7/02  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:19 )

(21)Application number : 03-284795

(71)Applicant : MERCIAN CORP

(22)Date of filing : 30.10.1991

(72)Inventor : NISHIMURA HAJIME  
 KAWAKAMI YASUSHI  
 IMAMURA KOJI

(30)Priority

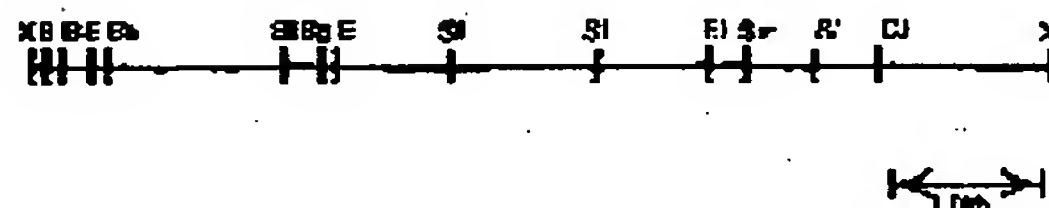
Priority number : 03 84170    Priority date : 16.04.1991    Priority country : JP

## (54) BENZENE DIOXYGENASE GENE

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain the subject gene, containing a benzene dioxygenase gene and cisbenzene glycol dehydrogenase gene, etc., and capable of exhibiting a specific restriction enzyme map and efficiently affording cisbenzene glycol from benzene.

**CONSTITUTION:** Chromosomal DNA is separated from *Pseudomonas.aeruginosa* J1104 strain (FERM P-12180) having benzene-assimilating ability and digested with a restriction enzyme *Xho*I to afford the objective gene which is a DNA of about 7.2kb, containing a benzene dioxygenase gene, cisbenzene glycol dehydrogenase gene and catechol 2,3-oxygenase gene and having the number of cleavage with restriction enzymes as follows. *Pst*I and *Sph*I; 6, *Sal*I; 5, *Eco*RI (E) and *Bam*HI (B); 2, *Sma*I (Sm), *Bgl*II (Bg), *Sac*I (Sa), *Xho*I (X) and *Cla*I (Cl); 1 and *Xba*I, *Hind*III and *Kpn*I; 0 and further a restriction enzyme map expressed by the formula.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

07.01.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

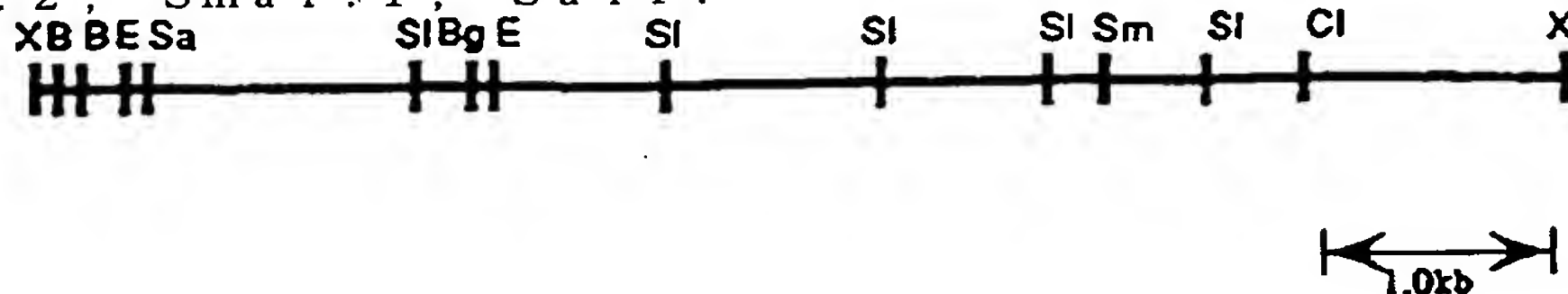
[Patent number]	3001694
[Date of registration]	12.11.1999
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of extinction of right]	



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ遺伝子、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ遺伝子を含む約7.2 K bのDNAであって、制限酵素の切断数がP s t I :

6 ; E c o R I : 2 ; S m a I : 1 ; S a l I :



5 ; B g l I I I : 1 ; B a m H I : 2 ; S a c I : 1 ; X h o I : 1 ; X b a I : 0 ; H i n d I I I : 0 ; K p n I : 0 ; S p h I : 6 ; 及び C l a I : 1 であり、以下に示す制限酵素地図

## 【化1】

(上記制限酵素地図中、B:BamH I; Bg:Bgl I I; Cl:Cla I;

E:EcoR I; Sa:Sac I; Sl:Sal I; Sm:Sma I; 及び X:Xho Iを示す)

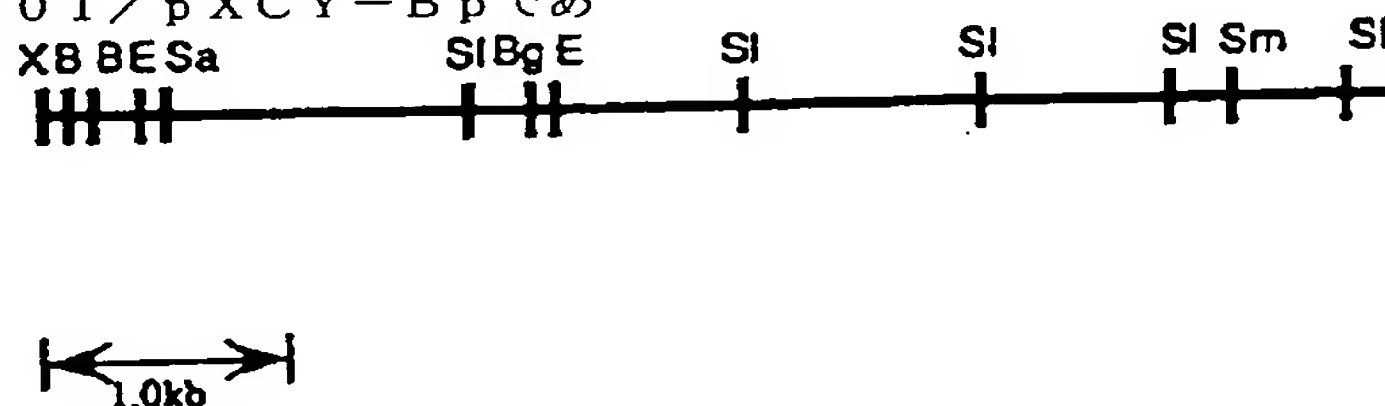
を有することを特徴とするDNA。

【請求項2】 請求項1記載のDNAを有する組み換えベクターDNA。

【請求項3】 プラスミドp X C Y - B pである請求項 20 2記載の組み換えベクターDNA。

【請求項4】 請求項2記載のベクターで形質転換されベンゼンジオキシゲナーゼ、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼを産生する微生物。

【請求項5】 大腸菌H B 1 0 1 / p X C Y - B pであ



(上記制限酵素地図中、B:BamH I; Bg:Bgl I I; E:EcoR I;

Sa:Sac I; Sl:Sal I; Sm:Sma I; 及び X:Xho Iを示す)

を有することを特徴とするDNA。

【請求項7】 請求項6記載のDNAを有する組み換えベクターDNA。

【請求項8】 プラスミドp B P T 8 - 1である請求項 7記載の組み換えベクターDNA。

【請求項9】 請求項8記載のベクターで形質転換され

## 領域 I

ATG AGC TCA TCA ATC AAA GAA GTG CAG GGA GCC CCT GTG AAG TGG GTT  
ACC AAT TGG ACG CCG GAG GCG ATC CGG GGG TTG GTC GAT CAG GAA AAA  
GGG CTG CTT GAT CCA CGC ATC TAC GCC GAT CAG AGT CTT TAT GAG CTG  
GAG CTT GAG CGG GTT TTT GGT CGC TCT TGG CTG TTA CTT GGG CAC GAG  
AGT CAT GTG CCT GAA ACC GGG GAC TTC CTG GCC ACT TAC ATG GGC GAA  
GAT CCG GTG GTT ATG GTG CGA CAG AAA GAC AAG AGC ATC AAG GTG TTC

る請求項4記載の微生物。

【請求項6】 ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.6 K bのDNAであって、制限酵素の切断数がP s t I : 4 ; E c o R I : 2 ; S m a I : 1 ; S a l I : 5 ; B g l I I I : 1 ; B a m H I : 2 ; S a c I : 1 ; X h o I : 1 ; X b a I : 0 ; H i n d I I I : 0 ; K p n I : 0 ; S p h I : 6 ; 及び C l a I : 0 であり、以下に示す制限酵素地図

## 【化2】

ベンゼンジオキシゲナーゼを産生する微生物。

【請求項10】 大腸菌H B 1 0 1 / p B P T 8 - 1 である請求項9記載の微生物。

【請求項11】 以下に示す領域 I、II、III、IV、及びVを含み、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードするD N A。

CTG AAC CAG TGC CGC GGC ATG CGT ATC TGC CGC TCG GAC GCC GGC AAC  
 GCC AAG GCT TTC ACC TGC AGC TAT CAC GGC TGG GCC TAC GAC ATC GCC  
 GGC AAG CTG GTG AAC GTG CCG TTC GAG AAG GAA GCC TTT TGC GAC AAG  
 AAA GAA GGC GAC TGC GGC TTT GAC AAG GCC GAA TGG GGC CCG CTC CAG  
 GCA CGC GTG GCA ACC TAC AAG GGC CTG GTC TTT GCC AAC TGG GAT GTG  
 CAG GCG CCA GAC CTG GAG ACC TAC CTC GGT GAC GCC CGC CCC TAT ATG  
 GAC GTC ATG CTG GAT CGC ACG CCG GCC GGG ACT GTG GCC ATC GGC GGC  
 ATG CAG AAG TGG GTG ATT CCG TGC AAC TGG AAG TTT GCC GCC GAG CAG  
 TTC TGC AGT GAC ATG TAC CAC GCC GGC ACC ATG TCG CAC CTG TCC GGC  
 ATC CTG GCG GGC ATG CCG CCG GAA ATG GAC CTG TCG CAT GCA CAG GTG  
 CCC ACC AAG GGC AAC CAG TTC CCG GCC GGC TGG GGC GGC CAC GGC TCG  
 GGC TGG TTC GTC GAC GAG CCG GGC ATG CTC ATG GCG GTG ATG GGC CCC  
 AAG GTC ACC CAG TAC TGG ACC GAA GGT CCG GCT GCC GAC CTG GCA GAA  
 CAG CGA CTG GGC CAC ACC ATG CCG GTT CGA CGC ATG TTC GGC CAG CAC  
 ATG ACG ATC TTC CCG ACC TGT TCA TTC CTG CCC GCC ATC AAC ACC ATC  
 CCG ACC TGG CAC CCG CGT GGT CCC AAT GAA ATC GAG GTG TGG GCC TTC  
 ACC CTG GTC GAT GCC GAC GCC CCG GCG GAG ATC AAG GAA GAA TAT CGC  
 CCG CAC AAC ATC CGC ACC TTC TCC GCA GGC GGC GTG TTT GAG CAG GAC  
 GAT GGC GAG AAC TGG GTG GAG ATC CAG AAG GGG CTA CGT GGG TAC AAG  
 GCC AAG AGC CAG CCG CTC AAT GCC CAG ATG GGC CTG GGT CCG TGC AGA  
 CCG GAT CAC CCT GAT TTT CCT GGC AAC GTC GGC

## 領域II

ATG GTG GGC TGG ACG TGC ATG TGC AGA CGG CGC GCC GAG GTT CCG TCC  
 CCT GAT ATT TAC TTG GAG ATA ACT ATT ATG ACA AAT CCA TCC CCG CAT  
 TTT TTC AAA ACA TTT GAA TGG CCA AGC AAG GCG GCT GGC CTT GAG TTG  
 CAG AAC GAG ATC GAG CAG TTC TAC TAC CGC GAA GCG CAG TTG CTT GAC  
 CAC CGG GCC TAC GAG GCC TGG TTT GCC CTG CTG GAC AAA GAT ATC CAC  
 TAC TTC ATG CCG CTG CGC ACC AAT CGC ATG ATC CGG GAG GGC GAG CTG  
 GAA TAT TCC GGC GAC CAG GAT ATT GCC CAT TTC GAT GAA ACC CAT GAA  
 ACC ATG TAC GGG CGC ATC CGC AAG GTG ACC TCG GAC GTG GGC TGG GCG  
 GAG AAC CCG CCT TCC CGC ACG CGC CAC CTG GTC TCC AAC GTC ATC GTC  
 AAG GAG ACG GCC ACG CCG GAT ACC TTC GAG GTC AAT TCC GCA TTC ATC  
 CTG TAC CGC AAT CGG CTT GAG CGC CAG GTC GAC ATC TTC GCG GGC GAA  
 CGC CGG GAC GTG CTG CGC CGC GCC GAC AAC AAC CTT GGT TTC AGC ATC  
 GCC AAG CGC ACC ATC CTG CTC GAC GCC AGT ACC TTG CTG TCG AAC AAC  
 CTG AGC ATG TTC TTC

## 領域III

ATG AAA AAT GCA AGA CTG TTT TTG ATC GCC ATC GGC GTC TTC TAC ATC  
 ATC AAC CTC ATT GGC ACG CTT CCC TTC AGC ACG TTG GGC TTG TTT GGC  
 AGG ATG TAT CCA GGC GTA GAA CTG CAC GTG GGT GCG CCG ATT TTC ACC  
 CTG CTG CAG GAT GCC TGG GCG GTG GTC GGT CTC CAG TTG GGC GCC ATC  
 GGG GCC GTC GCT TTG TGG GGC GCC CGC GAT CCG GGC CGT TAT CGG GCC  
 GTT ATT CCA GTG GTC ATC GCA ACG GAA GTG GTC GAT GGC CTC TGG GAT  
 TTT TAC AGC ATC GTG TGG AGC CAC GAA GCC TTG TGG TTC GGG CTT GTC  
 ACG CTG GTG ATC CAT GTG CTG TGG ATT GGC TGG GGC CTG CAT GCC TGG  
 CGT GCC TGG CGT CGA AAT CGC

## 領域IV

ATG AAA TTT ACC AGA GTT TGT GAT CGA AGA GAT GTG CCC GAA GGC GAA  
 GCC CTG AAG GTC GAA AGT GGA GGC ACC TCC GTC GCG ATT TTC AAT GTG  
 GAT GGC GAG CTG TTC GCA ACA CAG GAC CGC TGC ACC CAC GGC GAC TGG

TCC CTG TCC GAT GGC GGC TAT CTT GAA GGT GAC GTG GTG GAA TGC TCA  
 CTG CAC ATG GGG AAG TTT TGC GTT CGC ACG GGC AAG GTC AAA TCA CCG  
 CCG CCC TGT GAG GCA CTG AAG ATA TTT CCG ATC CGC ATC GAA GAC AAT  
 GAC GTG CTG GTC GAC TTC GAA GCC GGG TAT CTG GCG CC

## 領域V

ATG ATC GAC ACC ATC GCC ATC ATC GGC GCC GGC CTG GCC GTT CGA CGG  
 CTG CGC GCG CAC TGC CGC CAG GGA TAC GAG GGG CGC ATC CAC CTG CTC  
 GGG GAT GAG TCG CAT CAG GCC TAT GAC CGG ACC ACG CTG TCC AAG ACG  
 GTG CTG GCG GGC GAG CAG CCC GAG CCG CCT GCA ATC CTG GAC AGC GCC  
 TGG TAC GCA TCG GCC CAT GTG GAT GTC CAG CTC GGG CGA CGG GTG AGT  
 TGC CTG GAT CTG GCC AAC CGC CAG ATT CAG TTT GAA TCG GGC GCC CCG  
 CTG GCC TAC GAC CGG CTG CTG CTG GCC ACC GGC GCG CGC GCC CGG CGC  
 ATG GCG ATT CGG GGT GGC GAC CTG GCA GGC ATC CAT ACC TTG CGA GAC  
 CTC GCC GAC AGC CAG GCG CTG CGG CAG GCG CTG CAA CCG GGC CAG TCG  
 CTG GTC ATC GTC GGC GGA GGC CTG ATC GGT TGC GAG GTG GCG ACC ACC  
 GCC CGC AAG CTG AGT GTC CAT GTC ACG ATT CTG GAA GCC GGC GAC GAG  
 TTG CTG GTG CGC GTG CTG GGT CAC CGG ACC GGG GCA TGG TGT CGG GCC  
 GAA CTG GAA CGC ATG GGT GTC CGC GTG GAG CGC AAT GCA CAG GCC GCG  
 CGC TTC GAA GGC CAG GGG CAG GTG CGC GCC GTG ATC TGC GCC GAC GGG  
 CGC CGG GTG CCC GCC GAT GTG GTC TTG GTC AGC ATT GGC GCC GAG CCG  
 GCG GAC GAG CTG GCC CGT GCC GCT GGC ATC GCC TGC GCG CGC GGC GTG  
 CTG GTC GAC GCC ACC GGC GCC ACC TCG TGT CCA GAG GTG TTC GCC GCC  
 GGT GAC GTC GCC GCC TGG CCG CTG CGT CAA GGG GGC CAG CGC TCG CTG  
 GAG ACC TAC CTG AAC AGC CAG ATG GAG GCC GAA ATC GCG GCC AGC GCC  
 ATG TTG AGT CAG CCC GTG CCG GCG CCC CAG GTG CCG ACC TCG TGG ACG  
 GAG ATT GCA GGC CAC CGC ATC CAG ATG ATT GGC GAT GCC GAA GGG CCC  
 GGC GAG ATC GTC GTA CGC GGC GAC GCC CAG AGC GGC CAG CCA ATC GTG  
 TTG CTC AGG CTG CTT GAT GGC TGC GTC GAG GCC GCG ACG GCG ATC AAT  
 GCC ACC AGG GAA TTT TCT GTG GCG ACC CGA CTG GTC GGC ACC CGG GTT  
 TCT GTT TCC GCC GAG CAA CTG CAG GAC GTC GGC TCG AAC CTG CGG GAT  
 TTA CTC AAA GCC AAA CCG AAT

【請求項12】 下記のポリペプチドをコードするDNA。 A。

Met Ser Ser Ser Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val  
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys  
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu  
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu  
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu  
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe  
 Leu Asn Gln Cys Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala Gly Asn  
 Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp Ile Ala  
 Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys Asp Lys  
 Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro Leu Gln  
 Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp Asp Val  
 Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro Tyr Met  
 Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile Gly Gly  
 Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala Glu Gln  
 Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu Ser Gly  
 Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala Gln Val  
 Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His Gly Ser  
 Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met Gly Pro



Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu Ala Glu  
 Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly Gln His  
 Met Thr Ile Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn Thr Ile  
 Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp Ala Phe  
 Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu Tyr Arg  
 Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu Gln Asp  
 Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly Tyr Lys  
 Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg Cys Arg  
 Pro Asp His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly

【請求項13】 下記のポリペプチドをコードするDN 10 A。

Met Val Gly Trp Thr Cys Met Cys Arg Arg Arg Ala Glu Val Pro Ser  
 Pro Asp Ile Tyr Leu Glu Ile Thr Ile Met Thr Asn Pro Ser Pro His  
 Phe Phe Lys Thr Phe Glu Trp Pro Ser Lys Ala Ala Gly Leu Glu Leu  
 Gln Asn Glu Ile Glu Gln Phe Tyr Tyr Arg Glu Ala Gln Leu Leu Asp  
 His Arg Ala Tyr Glu Ala Trp Phe Ala Leu Leu Asp Lys Asp Ile His  
 Tyr Phe Met Pro Leu Arg Thr Asn Arg Met Ile Arg Glu Gly Glu Leu  
 Glu Tyr Ser Gly Asp Gln Asp Ile Ala His Phe Asp Glu Thr His Glu  
 Thr Met Tyr Gly Arg Ile Arg Lys Val Thr Ser Asp Val Gly Trp Ala  
 Glu Asn Pro Pro Ser Arg Thr Arg His Leu Val Ser Asn Val Ile Val  
 Lys Glu Thr Ala Thr Pro Asp Thr Phe Glu Val Asn Ser Ala Phe Ile  
 Leu Tyr Arg Asn Arg Leu Glu Arg Gln Val Asp Ile Phe Ala Gly Glu  
 Arg Arg Asp Val Leu Arg Arg Ala Asp Asn Asn Leu Gly Phe Ser Ile  
 Ala Lys Arg Thr Ile Leu Leu Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ser Asn Asn  
 Leu Ser Met Phe Phe

【請求項14】 下記のポリペプチドをコードするDN A。

Met Lys Asn Ala Arg Leu Phe Leu Ile Ala Ile Gly Val Phe Tyr Ile  
 Ile Asn Leu Ile Gly Thr Leu Pro Phe Ser Thr Leu Gly Leu Phe Gly  
 Arg Met Tyr Pro Gly Val Glu Leu His Val Gly Ala Pro Ile Phe Thr  
 Leu Leu Gln Asp Ala Trp Ala Val Val Gly Leu Gln Leu Gly Ala Ile  
 Gly Ala Val Ala Leu Trp Gly Ala Arg Asp Pro Gly Arg Tyr Arg Ala  
 Val Ile Pro Val Val Ile Ala Thr Glu Val Val Asp Gly Leu Trp Asp  
 Phe Tyr Ser Ile Val Trp Ser His Glu Ala Leu Trp Phe Gly Leu Val  
 Thr Leu Val Ile His Val Leu Trp Ile Gly Trp Gly Leu His Ala Trp  
 Arg Ala Trp Arg Arg Asn Arg

【請求項15】 下記のポリペプチドをコードするDN A。

Met Lys Phe Thr Arg Val Cys Asp Arg Arg Asp Val Pro Glu Gly Glu  
 Ala Leu Lys Val Glu Ser Gly Gly Thr Ser Val Ala Ile Phe Asn Val  
 Asp Gly Glu Leu Phe Ala Thr Gln Asp Arg Cys Thr His Gly Asp Trp  
 Ser Leu Ser Asp Gly Gly Tyr Leu Glu Gly Asp Val Val Glu Cys Ser  
 Leu His Met Gly Lys Phe Cys Val Arg Thr Gly Lys Val Lys Ser Pro  
 Pro Pro Cys Glu Ala Leu Lys Ile Phe Pro Ile Arg Ile Glu Asp Asn  
 Asp Val Leu Val Asp Phe Glu Ala Gly Tyr Leu Ala Pro

【請求項16】 下記のポリペプチドをコードするD NA。

Met Ile Asp Thr Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Val Arg Arg  
 Leu Arg Ala His Cys Arg Gln Gly Tyr Glu Gly Arg Ile His Leu Leu  
 Gly Asp Glu Ser His Gln Ala Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Ser Lys Thr  
 Val Leu Ala Gly Glu Gln Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Asp Ser Ala  
 Trp Tyr Ala Ser Ala His Val Asp Val Gln Leu Gly Arg Arg Val Ser  
 Cys Leu Asp Leu Ala Asn Arg Gln Ile Gln Phe Glu Ser Gly Ala Pro  
 Leu Ala Tyr Asp Arg Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ala Arg Ala Arg Arg

Met Ala Ile Arg Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ile His Thr Leu Arg Asp  
 Leu Ala Asp Ser Gln Ala Leu Arg Gln Ala Leu Gln Pro Gly Gln Ser  
 Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ile Gly Cys Glu Val Ala Thr Thr  
 Ala Arg Lys Leu Ser Val His Val Thr Ile Leu Glu Ala Gly Asp Glu  
 Leu Leu Val Arg Val Leu Gly His Arg Thr Gly Ala Trp Cys Arg Ala  
 Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Arg Val Glu Arg Asn Ala Gln Ala Ala  
 Arg Phe Glu Gly Gln Gly Gln Val Arg Ala Val Ile Cys Ala Asp Gly  
 Arg Arg Val Pro Ala Asp Val Val Leu Val Ser Ile Gly Ala Glu Pro  
 Ala Asp Glu Leu Ala Arg Ala Ala Gly Ile Ala Cys Ala Arg Gly Val  
 Leu Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Ser Cys Pro Glu Val Phe Ala Ala  
 Gly Asp Val Ala Ala Trp Pro Leu Arg Gln Gly Gly Gln Arg Ser Leu  
 Glu Thr Tyr Leu Asn Ser Gln Met Glu Ala Glu Ile Ala Ala Ser Ala  
 Met Leu Ser Gln Pro Val Pro Ala Pro Gln Val Pro Thr Ser Trp Thr  
 Glu Ile Ala Gly His Arg Ile Gln Met Ile Gly Asp Ala Glu Gly Pro  
 Gly Glu Ile Val Val Arg Gly Asp Ala Gln Ser Gly Gln Pro Ile Val  
 Leu Leu Arg Leu Leu Asp Gly Cys Val Glu Ala Ala Thr Ala Ile Asn  
 Ala Thr Arg Glu Phe Ser Val Ala Thr Arg Leu Val Gly Thr Arg Val  
 Ser Val Ser Ala Glu Gln Leu Gln Asp Val Gly Ser Asn Leu Arg Asp  
 Leu Leu Lys Ala Lys Pro Asn

【請求項17】 下記のポリペプチドI、II、III、I 20 V、及びVを含むベンゼンジオキシゲナーゼ。

ポリペプチドI

Met Ser Ser Ser Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val  
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys  
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu  
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu  
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu  
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe  
 Leu Asn Gln Cys Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala Gly Asn  
 Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp Ile Ala  
 Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys Asp Lys  
 Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro Leu Gln  
 Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp Asp Val  
 Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro Tyr Met  
 Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile Gly Gly  
 Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala Glu Gln  
 Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu Ser Gly  
 Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala Gln Val  
 Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His Gly Ser  
 Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met Gly Pro  
 Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu Ala Glu  
 Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly Gln His  
 Met Thr Ile Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn Thr Ile  
 Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp Ala Phe  
 Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu Tyr Arg  
 Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu Gln Asp  
 Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly Tyr Lys  
 Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg Cys Arg  
 Pro Asp His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly

ポリペプチドII

Met Val Gly Trp Thr Cys Met Cys Arg Arg Arg Ala Glu Val Pro Ser



Pro Asp Ile Tyr Leu Glu Ile Thr Ile Met Thr Asn Pro Ser Pro His  
 Phe Phe Lys Thr Phe Glu Trp Pro Ser Lys Ala Ala Gly Leu Glu Leu  
 Gln Asn Glu Ile Glu Gln Phe Tyr Tyr Arg Glu Ala Gln Leu Leu Asp  
 His Arg Ala Tyr Glu Ala Trp Phe Ala Leu Leu Asp Lys Asp Ile His  
 Tyr Phe Met Pro Leu Arg Thr Asn Arg Met Ile Arg Glu Gly Glu Leu  
 Glu Tyr Ser Gly Asp Gln Asp Ile Ala His Phe Asp Glu Thr His Glu  
 Thr Met Tyr Gly Arg Ile Arg Lys Val Thr Ser Asp Val Gly Trp Ala  
 Glu Asn Pro Pro Ser Arg Thr Arg His Leu Val Ser Asn Val Ile Val  
 Lys Glu Thr Ala Thr Pro Asp Thr Phe Glu Val Asn Ser Ala Phe Ile  
 Leu Tyr Arg Asn Arg Leu Glu Arg Gln Val Asp Ile Phe Ala Gly Glu  
 Arg Arg Asp Val Leu Arg Arg Ala Asp Asn Asn Leu Gly Phe Ser Ile  
 Ala Lys Arg Thr Ile Leu Leu Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ser Asn Asn  
 Leu Ser Met Phe Phe

## ポリペプチドIII

Met Lys Asn Ala Arg Leu Phe Leu Ile Ala Ile Gly Val Phe Tyr Ile  
 Ile Asn Leu Ile Gly Thr Leu Pro Phe Ser Thr Leu Gly Leu Phe Gly  
 Arg Met Tyr Pro Gly Val Glu Leu His Val Gly Ala Pro Ile Phe Thr  
 Leu Leu Gln Asp Ala Trp Ala Val Val Gly Leu Gln Leu Gly Ala Ile  
 Gly Ala Val Ala Leu Trp Gly Ala Arg Asp Pro Gly Arg Tyr Arg Ala  
 Val Ile Pro Val Val Ile Ala Thr Glu Val Val Asp Gly Leu Trp Asp  
 Phe Tyr Ser Ile Val Trp Ser His Glu Ala Leu Trp Phe Gly Leu Val  
 Thr Leu Val Ile His Val Leu Trp Ile Gly Trp Gly Leu His Ala Trp  
 Arg Ala Trp Arg Arg Asn Arg

## ポリペプチドIV

Met Lys Phe Thr Arg Val Cys Asp Arg Arg Asp Val Pro Glu Gly Glu  
 Ala Leu Lys Val Glu Ser Gly Gly Thr Ser Val Ala Ile Phe Asn Val  
 Asp Gly Glu Leu Phe Ala Thr Gln Asp Arg Cys Thr His Gly Asp Trp  
 Ser Leu Ser Asp Gly Gly Tyr Leu Glu Gly Asp Val Val Glu Cys Ser  
 Leu His Met Gly Lys Phe Cys Val Arg Thr Gly Lys Val Lys Ser Pro  
 Pro Pro Cys Glu Ala Leu Lys Ile Phe Pro Ile Arg Ile Glu Asp Asn  
 Asp Val Leu Val Asp Phe Glu Ala Gly Tyr Leu Ala Pro

## ポリペプチドV

Met Ile Asp Thr Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Val Arg Arg  
 Leu Arg Ala His Cys Arg Gln Gly Tyr Glu Gly Arg Ile His Leu Leu  
 Gly Asp Glu Ser His Gln Ala Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Ser Lys Thr  
 Val Leu Ala Gly Glu Gln Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Asp Ser Ala  
 Trp Tyr Ala Ser Ala His Val Asp Val Gln Leu Gly Arg Arg Val Ser  
 Cys Leu Asp Leu Ala Asn Arg Gln Ile Gln Phe Glu Ser Gly Ala Pro  
 Leu Ala Tyr Asp Arg Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ala Arg Ala Arg Arg  
 Met Ala Ile Arg Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ile His Thr Leu Arg Asp  
 Leu Ala Asp Ser Gln Ala Leu Arg Gln Ala Leu Gln Pro Gly Gln Ser  
 Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ile Gly Cys Glu Val Ala Thr Thr  
 Ala Arg Lys Leu Ser Val His Val Thr Ile Leu Glu Ala Gly Asp Glu  
 Leu Leu Val Arg Val Leu Gly His Arg Thr Gly Ala Trp Cys Arg Ala  
 Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Arg Val Glu Arg Asn Ala Gln Ala Ala  
 Arg Phe Glu Gly Gln Gly Gln Val Arg Ala Val Ile Cys Ala Asp Gly  
 Arg Arg Val Pro Ala Asp Val Val Leu Val Ser Ile Gly Ala Glu Pro  
 Ala Asp Glu Leu Ala Arg Ala Ala Gly Ile Ala Cys Ala Arg Gly Val  
 Leu Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Ser Cys Pro Glu Val Phe Ala Ala  
 Gly Asp Val Ala Ala Trp Pro Leu Arg Gln Gly Gly Gln Arg Ser Leu

Glu Thr Tyr Leu Asn Ser Gln Met Glu Ala Glu Ile Ala Ala Ser Ala  
 Met Leu Ser Gln Pro Val Pro Ala Pro Gln Val Pro Thr Ser Trp Thr  
 Glu Ile Ala Gly His Arg Ile Gln Met Ile Gly Asp Ala Glu Gly Pro  
 Gly Glu Ile Val Val Arg Gly Asp Ala Gln Ser Gly Gln Pro Ile Val  
 Leu Leu Arg Leu Leu Asp Gly Cys Val Glu Ala Ala Thr Ala Ile Asn  
 Ala Thr Arg Glu Phe Ser Val Ala Thr Arg Leu Val Gly Thr Arg Val  
 Ser Val Ser Ala Glu Gln Leu Gln Asp Val Gly Ser Asn Leu Arg Asp  
 Leu Leu Lys Ala Lys Pro Asn

# 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ベンゼンを酸化してシスベンゼングリコールを生成する酵素活性を宿主微生物に付与する遺伝子を含むDNA、該DNAを含むプラスミド、及び該プラスミドで形質転換された微生物に関する。さらに本発明は、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA、及びベンゼンジオキシゲナーゼを構成するポリペプチドに関する。

## 【0002】

【従来の技術】シスベンゼングリコール（シス-1, 2-ジヒドロキシシクロヘキサ-3, 5-ジエン）は、エンジニアリングプラスチックとして最近特に注目を集めているポリパラフェニレンの原料として有用な化合物であり、生化学的には、カテコールを介してオルト-又はメタ-パスウェイを経てTCAサイクルにより代謝される重要な化合物である。

【0003】従来、微生物を利用してシスベンゼングリコールを製造する方法としては、シュードモナス属に属する微生物をベンゼンを含む培地で培養してその培養物からシスベンゼングリコールを採取する方法（特開昭5-8-71891号公報）が知られているが、該方法は効率が悪く実用的ではなかった。一方、シスベンゼングリコールの生物学的代謝過程と類似の代謝過程により、ビフェニルを代謝する機能を有する外来遺伝子を保有する微生物として、シュードモナス・プチダKF138株

（特開昭61-282068号公報）、シュードモナス・エルギノーザKF257株（特開昭61-282069号公報）、及びシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株（特開昭61-282085号公報）が知られているが、該微生物はビフェニルを資化する作用を有するものの、ベンゼンに対して代謝作用を示してシスベンゼングリコールを産生するものではなかった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】本発明者は、ベンゼンを酸化してシスベンゼングリコールを生成する機能を有するベンゼンジオキシゲナーゼを保有する微生物から、該酵素をコードする遺伝子を単離すべく鋭意努力した結果、シュードモナス・エルギノーザに属する微生物からベンゼンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明はベンゼンジオ

キシゲナーゼ遺伝子、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ遺伝子、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ遺伝子を含む約7.2 KbのDNAであって、図1に示す制限酵素地図を有することを特徴とするDNA、該DNAを有する組み換えベクターDNA、該ベクターで形質転換されベンゼンジオキシゲナーゼ、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼを産生する微生物と、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.6 KbのDNAであって図2に示す制限酵素地図を有することを特徴とするDNA、該DNAを有する組み換えベクターDNA、及び該ベクターで形質転換されベンゼンジオキシゲナーゼを産生する微生物を提供するものである。また、本発明により、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードするDNA、及びベンゼンジオキシゲナーゼを構成するポリペプチドが提供される。

【0005】ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子（BDO）を含むDNAの供給源としては、ベンゼンを資化してシスベンゼングリコールを生産する能力を有する微生物を利用することができ、この様な性質を有する微生物のうち、例えばシュードモナス属に属する微生物を利用することができる。シュードモナス属に属する微生物としては、例えばシュードモナス・エルギノーザJ1104を使用することが好ましい。シュードモナス・エルギノーザJ1104は東京で採取された土壌から分離された微生物であり、工業技術院微生物工業技術研究所に平成3年4月6日付けで受託番号微工研菌寄第12180（FERM P-12180）として寄託されており、菌学的性質は以下の通りである。

【0006】本菌は極鞭毛を有するグラム陰性の桿菌で、運動性があり、絶対好気性かつ糖非発酵性である。以上の性質と電子顕微鏡による観察から、本菌はシュードモナス（Pseudomonas）属に属する微生物であると認められた。そこで、H. Oyaizu 及びK. Komagata の菌体脂肪酸分析によるシュードモナスの分類を以下の様に行った（J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 17-14 (1983)）。

【0007】まず、凍結乾燥菌体を5%NaOH/50%MeOHを用いて100℃で1時間ケン化した後、抽出した脂肪酸を15%BCl<sub>3</sub>-MeOHを用いて85℃で5分間メチルエステル化し、次いでGLC分析を行った。ヒドロキシ酸はTLC分析により確認した。

GLC分析: 15% EGS (3.0 φmm×2.1m)、180℃

TLC分析: silica gel 60 TLC

(ジエチルエーテル: n-ヘキサン=1:4)

上記分析の結果、本菌の菌体脂肪酸成分は、12:0、14:0、16:0、16:1、18:0、18:1、Δ17、Δ19、3-OH・10:0、3-OH・12:0 (Trace)、2-OH・12:0から成ることが判明した。この他に、15:0、17:0、19:0も微量検出された。これらの分析結果より、本菌がH.Oyaizu 及びK. Komagata (J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 17-14 (1983)) のGroup 1に属することが確認された。このグループには、シュードモナス・エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*)、P.プチダ (*P.putida*)、P.オーレオファシエンス (*P.aureofaciens*)、P.クロロラフィス (*P.chlororaphis*)、P.フローレッセンス (*P.fluoresces*)、P.スツツェエ (*P.stutzeri*)、及びP.メンドシーナ (*P.*

mendocina)等が包含されている。そして、本菌の菌体脂肪酸成分から2-OH・12:0が検出されること、2-OH・16:0が検出されないこと、Δ19が著量検出されること等の特徴は、上記 Group 1中のP.エルギノーザの菌体脂肪酸パターンに最も類似するものであった。本菌の菌体よりDNAを抽出してDNAのG-C含量をTm法で測定したところ、G-C含量は66.3モル%であった。この値はP.エルギノーザのG-C含量=67.2-68.0モル%と比べるとやや低く、P.プチダのG-C含量=62.5モル%とは明らかに異なるものであった。そこでスー1、2-ジヒドロキシシクロヘキサ-3,5-ジエン生産菌として既知のP.プチダと本菌の菌学的性質を比較して、表1の結果を得た。

【0008】

表 1

分離菌	
I. 形態	
グラム染色性	陰性
運動性	有
鞭毛	極-1
II. 生理学的性質	
色素の生成	
蛍光色素	-
ピオシアニン	-
カロチノイド	ピンク
生育 (41℃)	±
オキシダーゼ反応	+
脱窒反応	+
ゼラチンの水解	-
澱粉の水解	-
III. 生育	
グルコース	+
マルトース	±
シュークロース	-
マンニトール	-
グリセロール	+
L-リンゴ酸	+
酒石酸	-
コハク酸	+
マロン酸	-
ベタイン	+
ザルコシン	+
ガラニオール	+
β-アラニン	+

DL-アルギニン	+
L-セリン	-
チロシン	+

但し、+：陽性

これらの結果から明らかなように、本菌はP.プチダとは明確に区別され、最も類似した菌はP.エルギノーサである。しかしながら、本分離菌は、特にゼラチンの加水分解、マンニトール、マロン酸等に対する挙動がP.エルギノーサと異なっており、G-C含量もP.エルギノーサと比べてやや低く、菌体が僅かにピンク色を呈するなど微妙な相違点も認められることから、本菌をP.エルギノーサの新変種であると同定した。

【0009】ベンゼンを資化してシスベンゼングリコールを生産する能力を有する微生物からベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子(BDO)を含む遺伝子を切り出すには、例えば以下の方法によればよい。ベンゼン資化能を有する上記の微生物を適当な培地、例えばLB培地(1リットル中にトリプトン10g/酵母エキス5g/塩化ナトリウム5gを含む)等で培養した後、例えばリゾチームを用いて菌体を融解して常法により染色体DNAを調製し、例えば制限酵素XhoIで消化することによりベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約7.2KbのDNA断片(NKKI1)を得ることができる。この様にして得たDNA断片を、制限酵素XhoIで消化したベクター、例えばプラスミドベクターであるpHSG396とライゲーションし、例えばハナハン法によりコンピテントセルとした大腸菌HB101に該組み換えベクターを導入して形質転換体を得、その後に適当な選択手段、例えばクロラムフェニコールを含むLB培地で培養することにより形質転換株を選択することができる。

【0010】上記の形質転換株からベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む組み換えベクターを有する形質転換株を選択するには、形質転換株を培養後にカテコールを散布して黄色を呈するコロニーを選択すればよい。これはベンゼンオキシゲナーゼの遺伝子と同じ遺伝子領域にあるカテコール 2, 3-オキシゲナーゼを選択するものであり、カテコールがカテコール 2, 3-オキシゲナーゼで酸化された結果生成する2-ヒドロキシムコン酸6-セミアルデヒドが黄色を呈することを利用するものである。この様にして選択された形質転換体として、例えば大腸菌HB101/pXCY-Bpを挙げることができる。大腸菌HB101/pXCY-Bpは、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約7.2KbのDNA断片(NKKI1)を含む組み換えプラスミドpXCY-Bpにより形質転換された微生物であり、工業技術院微生物工業技術研究所に平成3年4月6日付けで受託番号微工研菌寄第12178号(FERM P-12178)として寄託されている。

【0011】プラスミドpXCY-Bpに挿入されたN

-：陰性

KKI1は、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子(BDO)、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(cBDH)、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ遺伝子(C23O)を含む約7.2KbのDNAであり、該NKKI1を消化する制限酵素の切断数はPstI:6; EcoRI:2; SmaI:1; SalI:5; BglII:1; BamHI:2; SacI:1; XhoI:1; XbaI:0; HindIII:0; KpnI:0; SphI:6; 及びClaI:1であり、NKKI1の制限酵素地図及び遺伝子のベンゼン代謝様式と遺伝子群との関係は図1に示す通りである。ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子としては特願昭62-278985号公報に記載されたものが知られているが、上記のNKKI1は上記公報に記載されたものとは異なる制限酵素地図を有するものである。

【0012】この様にして得られたプラスミドpXCY-Bp中のカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ及びシスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をエキソヌクレアーゼExoIIIにより除去することにより、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子のみを含むDNA断片、例えばNKKI1-1(約5.6Kb)を得ることができる。上記のNKKI1(約7.2Kb)を制限酵素KpnI及びXbaIで消化した後にエキソヌクレアーゼExoIIIで処理し、マングベーンヌクレアーゼで処理してDNAの1本鎖部分を除去し、その後にクレノウフラグメントを加えてDNA末端の平滑化を行い、常法に従ってライゲーションすることにより、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を有する組み換えプラスミドを得ることができる。この様なプラスミドとしてプラスミドpBPT8-1を挙げることができ、該プラスミドを用いて常法により形質転換された形質転換体を、前記の方法により選択することにより大腸菌HB101/pBPT8-1を得ることができる。大腸菌HB101/pBPT8-1は、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.6KbのDNA断片(NKKI1-1)を含むプラスミドpBPT8-1により形質転換された微生物であり、工業技術院微生物工業技術研究所に平成3年4月6日付けで受託番号微工研菌寄第12179号(FERM P-12179)として寄託されている。

【0013】プラスミドpBPT8-1に挿入されたNKKI1-1は、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子(BDO)を含む約5.6KbのDNAであり、該NKKI1-1を消化する制限酵素の切断数はPstI:4; EcoRI:2; SmaI:1; SalI:5; BglII:1; BamHI:2; SacI:1; Xh



o I : 1 ; X b a I : 0 ; H i n d I I I : 0 ;  
K p n I : 0 ; S p h I : 6 ; 及び C l a I : 0 であ  
り、N K K I 1 - 1 の制限酵素地図は図2に示す通りで  
ある。

【0014】この様にして得た形質転換体を利用するこ  
とによりベンゼンからシスベンゼングリコールを効率よ  
く製造することができる。例えば、形質転換された微生物  
を例えばM56等の培地中で、でエタノール、酢酸、  
グルコース、乳酸等のエネルギー源およびベンゼンの存  
在下、好ましくはベンゼンの蒸気下に培養することにより  
培地中にシスベンゼングリコールが製造される。反応  
は25~42℃、好ましくは37℃で通常2~24時間  
行えばよく、原料となるベンゼンの濃度は培養液の全量  
に対して0.07~0.2%程度とすればよい。反応終了後  
に、培養液からエーテル、塩化メチレン等を用いて抽出  
することによりシスベンゼングリコールを効率よく製造  
することができる。

#### 【0015】

【発明の効果】ベンゼンの酸化によるシスベンゼングリ  
コールの製造に有用なベンゼンジオキシゲナーゼをコード  
する遺伝子、及びシスベンゼングリコールを効率よく  
産生する能力を有する微生物が提供された。また、該微  
生物を利用することによりシスベンゼングリコールを安  
価に製造することが可能になった。

#### 【0016】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに具体的に  
説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

#### 実施例1

ベンゼン資化能を有するシュードモナス・エルギノーザ  
J I 1 0 4 株を100mlのLB培地（1リットル中にトリ  
プトン10g/酵母エキス5g/塩化ナトリウム5g  
を含む）で一晩培養した後に集菌して50mMリン酸緩衝  
液で洗浄した後に、菌体に10mlのSTE（10mMトリ  
ス（pH7.5）/1mMEDTA/100mM塩化ナトリウ  
ム）と5mMのリゾチームを加えて37℃で30分間イン  
キュベートし、その後に-80℃で30分間凍結した。  
菌体を融解し、0.8%サルコシルを含む20mlのSTE  
と10mgのプロナーゼEを加えて37℃で1時間インキ  
ュベートした後にフェノール処理とエタノール沈澱を行  
った。得られたDNAから多糖類を除いた後、さらにフ  
ェノール処理とエタノール沈澱を行い、得られたDNA  
を10mMトリス/1mMEDTA緩衝液に懸濁した。

#### 【0017】得られたDNAを制限酵素S a u 3 A I

（Y-100緩衝液：10mMトリス（pH7.5）/10mM  
塩化マグネシウム/100mM塩化ナトリウム/6mMメル  
カプトエタノールを含む）を用いて37℃で30分間処  
理して部分消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によ  
って5Kbから7KbのDNA断片を切り出した。この  
DNA断片と制限酵素B a m H I で消化したプラスミド  
p U C 1 9 とライゲーションを行い、得られた組み換え

プラスミドpCY13を、宿主である大腸菌HB101  
に導入してアンピシリン50μg/mlを含むLB培地で  
成育可能な形質転換体を得た。

【0018】この培地上のコロニーに対しカテコール5  
0mMを噴霧して黄変するコロニーを選択した。該コロ  
ニーを培養することにより得られた菌体からカテコール  
2, 3-オキシゲナーゼ遺伝子を有するプラスミドpC  
Y13を抽出し、ジデオキシ法により塩基配列を決定し  
た。これによりカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ遺  
伝子の遺伝子上での向きを明らかにし、pCY13に挿  
入されたDNAの5'上流をプローブとして、シュード  
モナス・エルギノーザJ I 1 0 4より抽出したDNAを  
種々の制限酵素で消化したものを、1.0%アガロースゲ  
ル電気泳動によりサザンブロッティングを行った。この結  
果、制限酵素X h o Iによって消化される約7KbのD  
NA断片中にカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ及び  
その上流を含むオペロンが含まれていることが推定され  
た。

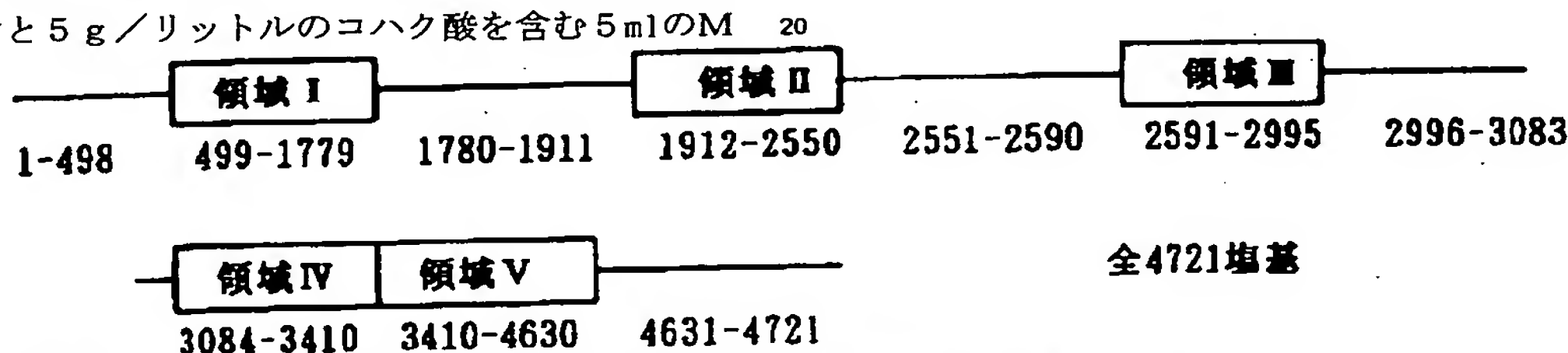
【0019】シュードモナス・エルギノーザJ I 1 0 4  
染色体DNAを制限酵素X h o Iで消化し、0.8%アガ  
ロースゲルで電気泳動後、6Kbから8KbのDNA断  
片を切り出し、制限酵素X h o Iで消化したプラスミド  
p H S G 3 9 6 とライゲーションし、得られた組み換え  
プラスミドを大腸菌HB101に導入してクロラムフェ  
ニコール34μg/mlを含むLB培地で培養し形質転換  
株を選択した。この培地上のコロニーにカテコール50  
mMを噴霧して黄変するコロニーを選択した。選択された  
形質転換株を5mlのLB培地で一晩培養した後に集菌、  
洗浄し、プロリン20μg/mlとコハク酸5g/リット  
ルを含むM56培地（水1リットル中にNa<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O  
8.2g/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.7g/(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g/FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.23mg  
を含む）に再懸濁して、ベンゼン蒸気下に37℃で2時  
間培養した後に1mlを回収した。遠心分離により大腸菌  
を除き、さらに限外濾過によって分子量10,000以  
上の高分子を除いた後、HPLCによってシスベンゼン  
グリコール及びカテコールの生産を確認した。形質転換  
株からプラスミドpXCY-Bpを抽出して制限酵素処  
理、0.8%アガロースゲル電気泳動、6%アクリリルア  
ミドゲル電気泳動によってNKKI1の制限酵素地図を  
作成した（図1参照）。

【0020】さらにベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を  
含む挿入DNA断片（NKKI1-1:5.6Kb）を組  
み込んだプラスミドpBPT8-1を以下の様に作成し  
た。5μgのプラスミドpXCY-Bpを制限酵素Kp  
n I 及びX b a I で消化した後、フェノール処理とエタ  
ノール沈澱を行い、エキソヌクレアーゼE x o III 緩衝  
液（50mMトリス/1mM塩化マグネシウム/1mM2-メ  
ルカプトエタノール）に懸濁し、150ユニットのエキ  
ソヌクレアーゼE x o III を加えて37℃で5分間イン  
キュベートした、その後65℃で5分間インキュベート

してエキソヌクレアーゼ Exo III を失活させた。さらに等量のマングビーンヌクレアーゼ緩衝液 (60 mM 酢酸ナトリウム / 100 mM 塩化ナトリウム / 2 mM 酢酸亜鉛 / 10% グリセリン) 及び5ユニットのマングビーンヌクレアーゼを加えて37℃で1時間インキュベートしてDNAの1本鎖部分の除去を行った。さらにフェノール処理とエタノール沈澱を行ったうえで、クレノウフラグメント緩衝液 (6.7 mM リン酸カリウム / 6.7 mM 塩化マグネシウム / 1 mM 2-メルカプトエタノール / 33  $\mu$ M dNTP) に懸濁し、5ユニットのクレノウフラグメントを加え37℃で15分間インキュベートしてDNA末端の平滑化を行い、常法に従ってライゲーションし、大腸菌 HB101 に導入した。尚、NKKI1-1 の制限酵素地図は図2に示す通りである。

#### 実施例2

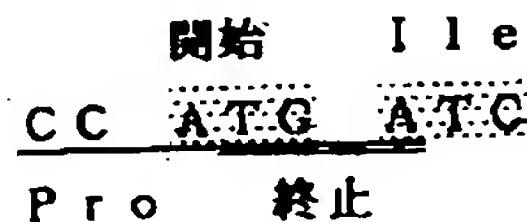
ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含むプラスミド pBPT8-1 で形質転換された大腸菌 HB101 を、5 ml の LB 培地を用いて37℃で一晩培養した。4  $\times$  10<sup>9</sup> セル / ml の HB101 を集菌して洗浄し、20  $\mu$ g / ml のプロリンと5 g / リットルのコハク酸を含む5 ml の M



【0022】該配列において、領域IVと領域Vの間は、領域IVをコードする配列が3411番目から3413番目の終止コドンで終了し、領域Vをコードする配列は3410番目から3412番目の開始コドンで開始するため、下記の様に一部DNAが2重に読み込まれる。

【0023】

【化4】



【0024】このため、以下の配列表においては、3408番目から3409番目の塩基によりコードされるアミノ酸をProとして表示してある。

【0025】

#### 配列

```

CTCGAGAGCG AATGTACGCC AAAGCGTGCT GAATGGTGAC GCTGAATGGG AGGCCGGGAT 60
CGTCAGTTCG TTTCACCGAC TGTCATTGAT TGAAGAGCCC ACCATCGCGG ATCCGGCTCG 120
CTGGTTTAAT GAGTGGGAGC CAGTCAACCG CCGGTTTTC ACGAAGCTCTT ATCTCTGCCC 180
TGTTCTGTCG TCTGGATCCG GCGGTTTCTG TCCATCCTGT ATGTGCATAT GGAGCGCTAC 240
CGCCGATTGA CTGCTATGCA CAACCCGCCT ACCAGAAACG TACATGAGGA GCATCTAGCA 300
CTTCGCGACA GCCGCTCGCC GGAGATGCCG AGCGCTGTGC TCGGTTGATG GCGGAGCACA 360
TCGAATCATC AATTTCCGTG GTTCGGGAAT TCGGTTTGTG GAGGTGACGC CAACATCCCA 420
CGTGTGTTGT TTCGTCTGTA TGGATGCGGT CGGCATTTTT TCGCCCTACT AAGGCCATTT 480

```

56培地に再懸濁した。ベンゼン蒸気下で22時間培養し、遠心分離、限外濾過によって精製して、HPLCによりシスベンゼングリコールの濃度を測定し (OD 275 nm)、シスベンゼングリコールが生産されたことを確認した。

#### 実施例3

上記のNKKI1-1の塩基配列は以下の様にして決定した。NKKI1-1を各制限酵素により切り出した後にM13プラスミドに組み換え、またはNKKI1-1をクロシーケンス法により削り縮めたサンプルを作製し、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードする4.7 kbについてジデオキシ法により塩基配列を決定した。組み換えDNA作製法、クロシーケンス法、ジデオキシ法については常法に従った。その結果、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードするDNAの配列は、以下に示す様に、5つのコード領域を含む4721塩基配列であることが明らかになった。

【0021】

【化3】

【配列表】配列の長さ: 7421

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源:

生物名: シュートモナス エルギノサ (Pseudomonas aeruginosa)

株名: JI104

配列の特徴

特徴を表す記号: -10 signal

存在位置: 479..484

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: -35 signal

存在位置: 455..460

特徴を決定した方法: S



23	24
CAAAGGAGAC GTTGAATC	498
ATG AGC TCA TCA ATC AAA GAA GTG CAG GGA GCC CCT GTG AAG TGG GTT	546
Met Ser Ser Ser Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val	
1 5 10 15	
ACC AAT TGG ACG CCG GAG GCG ATC CGG GGG TTG GTC GAT CAG GAA AAA	594
Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys	
20 25 30	
GGG CTG CTT GAT CCA CGC ATC TAC GCC GAT CAG AGT CTT TAT GAG CTG	642
Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu	
35 40 45	
GAG CTT GAG CGG GTT TTT GGT CGC TCT TGG CTG TTA CTT GGG CAC GAG	690
Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu	
50 55 60	
AGT CAT GTG CCT GAA ACC GGG GAC TTC CTG GCC ACT TAC ATG GGC GAA	738
Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu	
65 70 75 80	
GAT CCG GTG GTT ATG GTG CGA CAG AAA GAC AAG AGC ATC AAG GTG TTC	786
Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe	
85 90 95	
CTG AAC CAG TGC CGC GGC ATG CGT ATC TGC CGC TCG GAC GCC GGC AAC	834
Leu Asn Gln Cys Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala Gly Asn	
100 105 110	
GCC AAG GCT TTC ACC TGC AGC TAT CAC GGC TGG GCC TAC GAC ATC GCC	882
Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp Ile Ala	
115 120 125	
GGC AAG CTG GTG AAC GTG CCG TTC GAG AAG GAA GCC TTT TGC GAC AAG	930
Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys Asp Lys	
130 135 140	
AAA GAA GGC GAC TGC GGC TTT GAC AAG GCC GAA TGG GGC CCG CTC CAG	978
Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro Leu Gln	
145 150 155 160	
GCA CGC GTG GCA ACC TAC AAG GGC CTG GTC TTT GCC AAC TGG GAT GTG	1026
Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp Asp Val	
165 170 175	
CAG GCG CCA GAC CTG GAG ACC TAC CTC GGT GAC GCC CGC CCC TAT ATG	1074
Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro Tyr Met	
180 185 190	
GAC GTC ATG CTG GAT CGC ACG CCG GCC GGG ACT GTG GCC ATC GGC GGC	1122
Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile Gly Gly	
195 200 205	
ATG CAG AAG TGG GTG ATT CCG TGC AAC TGG AAG TTT GCC GCC GAG CAG	1170
Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala Glu Gln	
210 215 220	
TTC TGC AGT GAC ATG TAC CAC GCC GGC ACC ATG TCG CAC CTG TCC GGC	1218
Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu Ser Gly	
225 230 235 240	
ATC CTG GCG GGC ATG CCG CCG GAA ATG GAC CTG TCG CAT GCA CAG GTG	1266
Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala Gln Val	
245 250 255	
CCC ACC AAG GGC AAC CAG TTC CGG GCC GGC TGG GGC GGC CAC GGC TCG	1314

25

26

Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His Gly Ser  
 260 265 270  
 GGC TGG TTC GTC GAC GAG CCG GGC ATG CTC ATG GCG GTG ATG GGG CCC 1362  
 Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met Gly Pro  
 275 280 285  
 AAG GTC ACC CAG TAC TGG ACC GAA GGT CCG GCT GCC GAC CTG GCA GAA 1410  
 Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu Ala Glu  
 290 295 300  
 CAG CGA CTG GGC CAC ACC ATG CCG GTT CGA CGC ATG TTC GGC CAG CAC 1458  
 Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly Gln His  
 305 310 315 320  
 ATG ACG ATC TTC CCG ACC TGT TCA TTC CTG CCC GCC ATC AAC ACC ATC 1506  
 Met Thr Ile Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn Thr Ile  
 325 330 335  
 CGG ACC TGG CAC CCG CGT GGT CCC AAT GAA ATC GAG GTG TGG GCC TTC 1554  
 Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp Ala Phe  
 340 345 350  
 ACC CTG GTC GAT GCC GAC GCC CCG GCG GAG ATC AAG GAA GAA TAT CGC 1602  
 Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu Tyr Arg  
 355 360 365  
 CGG CAC AAC ATC CGC ACC TTC TCC GCA GGC GGC GTG TTT GAG CAG GAC 1650  
 Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu Gln Asp  
 370 375 380  
 GAT GGC GAG AAC TGG GTG GAG ATC CAG AAG GGG CTA CGT GGG TAC AAG 1698  
 Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly Tyr Lys  
 385 390 395 400  
 GCC AAG AGC CAG CCG CTC AAT GCC CAG ATG GGC CTG GGT CCG TGC AGA 1746  
 Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg Cys Arg  
 405 410 415  
 CCG GAT CAC CCT GAT TTT CCT GGC AAC GTC GGC 1779  
 Pro Asp His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly  
 420 425  
 TAGCTCTACG CCGAAGAAGC GGCGCGGGGT ATGTATCACC ACTGGATGCG CATGATGTCC 1839  
 GAGCCCAGCT GGGCCACGCT CAAGCCCTGA TCAAGACGCA ATCGTTAGAT CTGTCAACCG 1899  
 GAAGAATTCA AC 1911  
 ATG GTG GGC TGG ACG TGC ATG TGC AGA CGG CGC GCC GAG GTT CCG TCC 1959  
 Met Val Gly Trp Thr Cys Met Cys Arg Arg Arg Ala Glu Val Pro Ser  
 1 5 10 15  
 CCT GAT ATT TAC TTG GAG ATA ACT ATT ATG ACA AAT CCA TCC CCG CAT 2007  
 Pro Asp Ile Tyr Leu Glu Ile Thr Ile Met Thr Asn Pro Ser Pro His  
 20 25 30  
 TTT TTC AAA ACA TTT GAA TGG CCA AGC AAG GCG GCT GGC CTT GAG TTG 2055  
 Phe Phe Lys Thr Phe Glu Trp Pro Ser Lys Ala Ala Gly Leu Glu Leu  
 35 40 45  
 CAG AAC GAG ATC GAG CAG TTC TAC TAC CGC GAA GCG CAG TTG CTT GAC 2103  
 Gln Asn Glu Ile Glu Gln Phe Tyr Tyr Arg Glu Ala Gln Leu Leu Asp  
 50 55 60  
 CAC CGG GCC TAC GAG GCC TGG TTT GCC CTG CTG GAC AAA GAT ATC CAC 2151  
 His Arg Ala Tyr Glu Ala Trp Phe Ala Leu Leu Asp Lys Asp Ile His  
 65 70 75 80

TAC TTC ATG CCG CTG CGC ACC AAT CGC ATG ATC CCG GAG GGC GAG CTG	2199
Tyr Phe Met Pro Leu Arg Thr Asn Arg Met Ile Arg Glu Gly Glu Leu	
85 90 95	
GAA TAT TCC GGC GAC CAG GAT ATT GCC CAT TTC GAT GAA ACC CAT GAA	2247
Glu Tyr Ser Gly Asp Gln Asp Ile Ala His Phe Asp Glu Thr His Glu	
100 105 110	
ACC ATG TAC GGG CGC ATC CGC AAG GTG ACC TCG GAC GTG GGC TGG GCG	2295
Thr Met Tyr Gly Arg Ile Arg Lys Val Thr Ser Asp Val Gly Trp Ala	
115 120 125	
GAG AAC CCG CCT TCC CGC ACG CGC CAC CTG GTC TCC AAC GTC ATC GTC	2343
Glu Asn Pro Pro Ser Arg Thr Arg His Leu Val Ser Asn Val Ile Val	
130 135 140	
AAG GAG ACG GCC ACG CCG GAT ACC TTC GAG GTC AAT TCC GCA TTC ATC	2391
Lys Glu Thr Ala Thr Pro Asp Thr Phe Glu Val Asn Ser Ala Phe Ile	
145 150 155 160	
CTG TAC CGC AAT CGG CTT GAG CGC CAG GTC GAC ATC TTC GCG GGC GAA	2439
Leu Tyr Arg Asn Arg Leu Glu Arg Gln Val Asp Ile Phe Ala Gly Glu	
165 170 175	
CGC CGG GAC GTG CTG CGC CGC GCC GAC AAC AAC CTT GGT TTC AGC ATC	2487
Arg Arg Asp Val Leu Arg Arg Ala Asp Asn Asn Leu Gly Phe Ser Ile	
180 185 190	
GCC AAG CGC ACC ATC CTG CTC GAC GCC AGT ACC TTG CTG TCG AAC AAC	2535
Ala Lys Arg Thr Ile Leu Leu Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ser Asn Asn	
195 200 205	
CTG AGC ATG TTC TTC	2550
Leu Ser Met Phe Phe	
210	
TAGCCAGCA CGCTGAACCG GCCTCAATGA GGATGCTGCC	2590
ATG AAA AAT GCA AGA CTG TTT TTG ATC GCC ATC GGC GTC TTC TAC ATC	2638
Met Lys Asn Ala Arg Leu Phe Leu Ile Ala Ile Gly Val Phe Tyr Ile	
1 5 10 15	
ATC AAC CTC ATT GGC ACG CTT CCC TTC AGC ACG TTG GGC TTG TTT GGC	2686
Ile Asn Leu Ile Gly Thr Leu Pro Phe Ser Thr Leu Gly Leu Phe Gly	
20 25 30	
AGG ATG TAT CCA GGC GTA GAA CTG CAC GTG GGT GCG CCG ATT TTC ACC	2734
Arg Met Tyr Pro Gly Val Glu Leu His Val Gly Ala Pro Ile Phe Thr	
35 40 45	
CTG CTG CAG GAT GCC TGG GCG GTG GTC GGT CTC CAG TTG GGC GCC ATC	2782
Leu Leu Gln Asp Ala Trp Ala Val Val Gly Leu Gln Leu Gly Ala Ile	
50 55 60	
GGG GCC GTC GCT TTG TGG GGC GCC CGC GAT CCG GGC CGT TAT CGG GCC	2830
Gly Ala Val Ala Leu Trp Gly Ala Arg Asp Pro Gly Arg Tyr Arg Ala	
65 70 75 80	
GTT ATT CCA GTG GTC ATC GCA ACG GAA GTG GTC GAT GGC CTC TGG GAT	2878
Val Ile Pro Val Val Ile Ala Thr Glu Val Val Asp Gly Leu Trp Asp	
85 90 95	
TTT TAC AGC ATC GTG TGG AGC CAC GAA GCC TTG TGG TTC GGC CTT GTC	2926
Phe Tyr Ser Ile Val Trp Ser His Glu Ala Leu Trp Phe Gly Leu Val	
100 105 110	
ACG CTG GTG ATC CAT GTG CTG TGG ATT GGC TGG GGC CTG CAT GCC TGG	2974

29

30

Thr	Leu	Val	Ile	His	Val	Leu	Trp	Ile	Gly	Trp	Gly	Leu	His	Ala	Trp	
	115						120					125				
CGT	GCC	TGG	CGT	CGA	AAT	CGC										2995
Arg	Ala	Trp	Arg	Arg	Asn	Arg										
	130					135										
TGAGGACACT	TTGAATTACT	CTTCAGCCAC	CAACAGTGAC	TGTTCGCCCC	AGGCGATTTA											3055
ACCCTTTTAA	CTAATTACAA	GAAGCGTT														3083
ATG	AAA	TTT	ACC	AGA	GTT	TGT	GAT	CGA	AGA	GAT	GTG	CCC	GAA	GGC	GAA	3131
Met	Lys	Phe	Thr	Arg	Val	Cys	Asp	Arg	Arg	Asp	Val	Pro	Glu	Gly	Glu	
1			5				10				15					
GCC	CTG	AAG	GTC	GAA	AGT	GGA	GGC	ACC	TCC	GTC	GCG	ATT	TTC	AAT	GTG	3179
Ala	Leu	Lys	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Thr	Ser	Val	Ala	Ile	Phe	Asn	Val	
	20						25				30					
GAT	GGC	GAG	CTG	TTC	GCA	ACA	CAG	GAC	CGC	TGC	ACC	CAC	GGC	GAC	TGG	3227
Asp	Gly	Glu	Leu	Phe	Ala	Thr	Gln	Asp	Arg	Cys	Thr	His	Gly	Asp	Trp	
	35					40					45					
TCC	CTG	TCC	GAT	GGC	GGC	TAT	CTT	GAA	GGT	GAC	GTG	GTG	GAA	TGC	TCA	3275
Ser	Leu	Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	Leu	Glu	Gly	Asp	Val	Val	Glu	Cys	Ser	
	50					55					60					
CTG	CAC	ATG	GGG	AAG	TTT	TGC	GTT	CGC	ACG	GGC	AAG	GTC	AAA	TCA	CCG	3323
Leu	His	Met	Gly	Lys	Phe	Cys	Val	Arg	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ser	Pro	
65			70				75				80					
CCG	CCC	TGT	GAG	GCA	CTG	AAG	ATA	TTT	CCG	ATC	CGC	ATC	GAA	GAC	AAT	3371
Pro	Pro	Cys	Glu	Ala	Leu	Lys	Ile	Phe	Pro	Ile	Arg	Ile	Glu	Asp	Asn	
			85				90				95					
GAC	GTG	CTG	GTC	GAC	TTC	GAA	GCC	GGG	TAT	CTG	GCG	CC				3409
Asp	Val	Leu	Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Gly	Tyr	Leu	Ala	Pro				
	100						105									
ATG	ATC	GAC	ACC	ATC	GCC	ATC	ATC	GGC	GCC	GGC	CTG	GCC	GTT	CGA	CGG	3457
Met	Ile	Asp	Thr	Ile	Ala	Ile	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Arg	
1			5				10				15					
CTG	CGC	GCG	CAC	TGC	CGC	CAG	GGA	TAC	GAG	GGG	CGC	ATC	CAC	CTG	CTC	3505
Leu	Arg	Ala	His	Cys	Arg	Gln	Gly	Tyr	Glu	Gly	Arg	Ile	His	Leu	Leu	
	20						25				30					
GGG	GAT	GAG	TCG	CAT	CAG	GCC	TAT	GAC	CGG	ACC	ACG	CTG	TCC	AAG	ACG	3553
Gly	Asp	Glu	Ser	His	Gln	Ala	Tyr	Asp	Arg	Thr	Thr	Leu	Ser	Lys	Thr	
	35					40					45					
GTG	CTG	GCG	GGC	GAG	CAG	CCC	GAG	CCG	CCT	GCA	ATC	CTG	GAC	AGC	GCC	3601
Val	Leu	Ala	Gly	Glu	Gln	Pro	Glu	Pro	Pro	Ala	Ile	Leu	Asp	Ser	Ala	
	50					55					60					
TGG	TAC	GCA	TCG	GCC	CAT	GTG	GAT	GTC	CAG	CTC	GGG	CGA	CGG	GTG	AGT	3649
Trp	Tyr	Ala	Ser	Ala	His	Val	Asp	Val	Gln	Leu	Gly	Arg	Arg	Val	Ser	
65			70				75				80					
TGC	CTG	GAT	CTG	GCC	AAC	CGC	CAG	ATT	CAG	TTT	GAA	TCG	GGC	GCC	CCG	3697
Cys	Leu	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Gln	Ile	Gln	Phe	Glu	Ser	Gly	Ala	Pro	
			85				90				95					
CTG	GCC	TAC	GAC	CGG	CTG	CTG	CTG	GCC	ACC	GGC	GCG	CGC	GCC	CGG	CGC	3745
Leu	Ala	Tyr	Asp	Arg	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Ala	Arg	Ala	Arg	Arg	
	100						105				110					
ATG	GCG	ATT	CGG	GGT	GGC	GAC	CTG	GCA	GGC	ATC	CAT	ACC	TTG	CGA	GAC	3793

31

32

Met Ala Ile Arg Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ile His Thr Leu Arg Asp	
115 120 125	
CTC GCC GAC AGC CAG GCG CTG CGG CAG GCG CTG CAA CCG GGC CAG TCG	3841
Leu Ala Asp Ser Gln Ala Leu Arg Gln Ala Leu Gln Pro Gly Gln Ser	
130 135 140	
CTG GTC ATC GTC GGC GGA GGC CTG ATC GGT TGC GAG GTG GCG ACC ACC	3889
Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ile Gly Cys Glu Val Ala Thr Thr	
145 150 155 160	
GCC CGC AAG CTG AGT GTC CAT GTC ACG ATT CTG GAA GCC GGC GAC GAG	3937
Ala Arg Lys Leu Ser Val His Val Thr Ile Leu Glu Ala Gly Asp Glu	
165 170 175	
TTG CTG GTG CGC GTG CTG GGT CAC CGG ACC GGG GCA TGG TGT CGG GCC	3985
Leu Leu Val Arg Val Leu Gly His Arg Thr Gly Ala Trp Cys Arg Ala	
180 185 190	
GAA CTG GAA CGC ATG GGT GTC CGC GTG GAG CGC AAT GCA CAG GCC GCC	4033
Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Arg Val Glu Arg Asn Ala Gln Ala Ala	
195 200 205	
CGC TTC GAA GGC CAG GGG CAG GTG CGC GCC GTG ATC TGC GCC GAC GGG	4081
Arg Phe Glu Gly Gln Gly Gln Val Arg Ala Val Ile Cys Ala Asp Gly	
210 215 220	
CGC CGG GTG CCC GCC GAT GTG GTC TTG GTC AGC ATT GGC GCC GAG CCG	4129
Arg Arg Val Pro Ala Asp Val Val Leu Val Ser Ile Gly Ala Glu Pro	
225 230 235 240	
GCG GAC GAG CTG GCC CGT GCC GCT GGC ATC GCC TGC GCG CGC GGC GTG	4177
Ala Asp Glu Leu Ala Arg Ala Ala Gly Ile Ala Cys Ala Arg Gly Val	
245 250 255	
CTG GTC GAC GCC ACC GGC GCC ACC TCG TGT CCA GAG GTG TTC GCC GCC	4225
Leu Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Ser Cys Pro Glu Val Phe Ala Ala	
260 265 270	
GGT GAC GTC GCC GCC TGG CCG CTG CGT CAA GGG GGC CAG CGC TCG CTG	4273
Gly Asp Val Ala Ala Trp Pro Leu Arg Gln Gly Gly Gln Arg Ser Leu	
275 280 285	
GAG ACC TAC CTG AAC AGC CAG ATG GAG GCC GAA ATC GCG GCC AGC GCC	4321
Glu Thr Tyr Leu Asn Ser Gln Met Glu Ala Glu Ile Ala Ala Ser Ala	
290 295 300	
ATG TTG AGT CAG CCC GTG CCG GCG CCC CAG GTG CCG ACC TCG TGG ACG	4369
Met Leu Ser Gln Pro Val Pro Ala Pro Gln Val Pro Thr Ser Trp Thr	
305 310 315 320	
GAG ATT GCA GGC CAC CGC ATC CAG ATG ATT GGC GAT GCC GAA GGG CCC	4417
Glu Ile Ala Gly His Arg Ile Gln Met Ile Gly Asp Ala Glu Gly Pro	
325 330 335	
GGC GAG ATC GTC GTA CGC GGC GAC GCC CAG AGC GGC CAG CCA ATC GTG	4465
Gly Glu Ile Val Val Arg Gly Asp Ala Gln Ser Gly Gln Pro Ile Val	
340 345 350	
TTG CTC AGG CTG CTT GAT GGC TGC GTC GAG GCC GCG ACG GCG ATC AAT	4513
Leu Leu Arg Leu Leu Asp Gly Cys Val Glu Ala Ala Thr Ala Ile Asn	
355 360 365	
GCC ACC AGG GAA TTT TCT GTG GCG ACC CGA CTG GTC GGC ACC CGG GTT	4561
Ala Thr Arg Glu Phe Ser Val Ala Thr Arg Leu Val Gly Thr Arg Val	
370 375 380	

33

34

TCT GTT TCC GCC GAG CAA CTG CAG GAC GTC GGC TCG AAC CTG CGG GAT 4609  
 Ser Val Ser Ala Glu Gln Leu Gln Asp Val Gly Ser Asn Leu Arg Asp  
 385 390 395 400  
 TTA CTC AAA GCC AAA CCG AAT 4630  
 Leu Leu Lys Ala Lys Pro Asn  
 405  
 TGATGCGCAT GACCGGCGAA TCGCTTTAAC AATAAAGGGG ATTGGGGATT GGAAAAATGA 4690  
 AACTGAAAGG TGAACGGGTA CTGTCACGGG G 4721

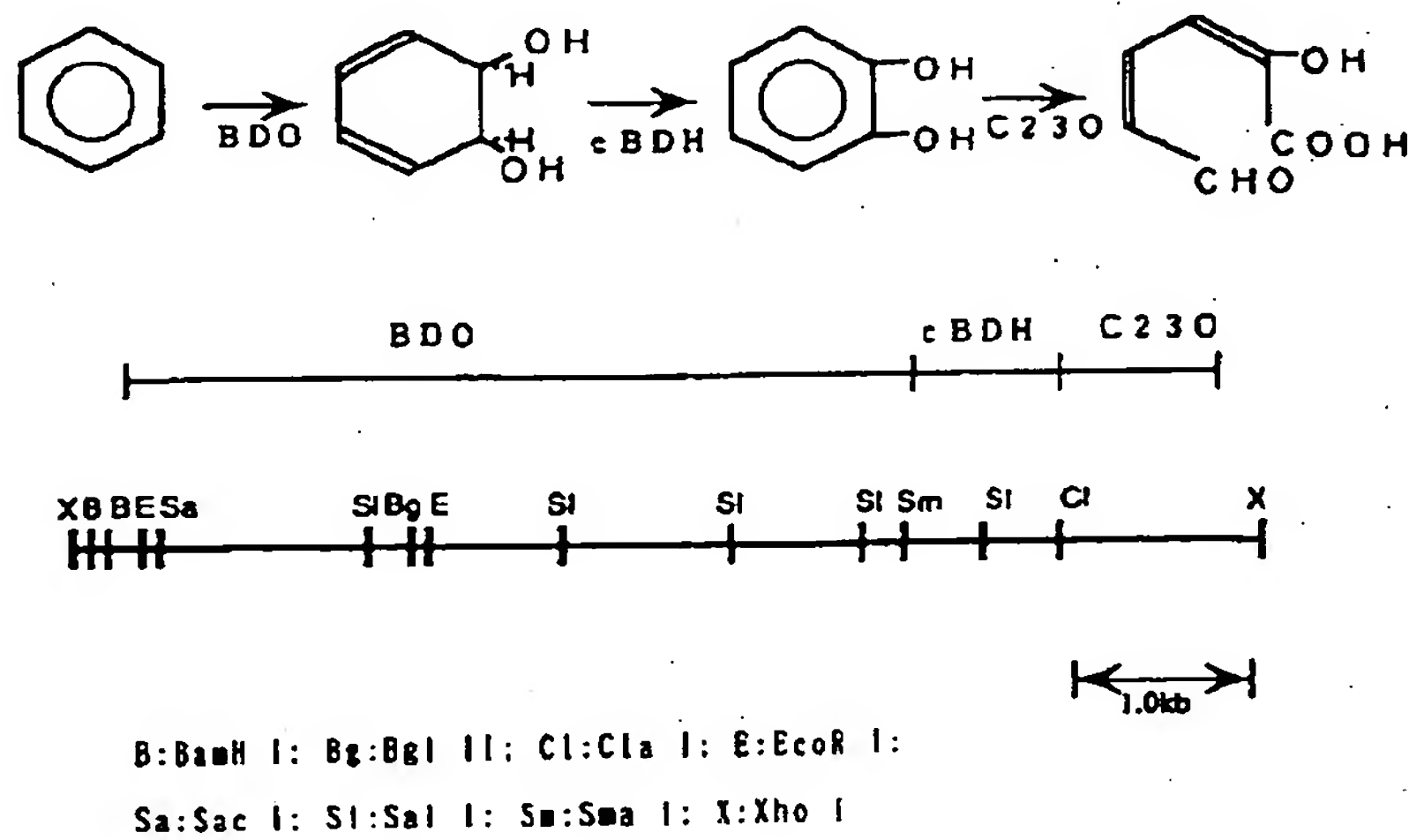
## 【図面の簡単な説明】

【図1】 NKKI 1の制限酵素地図、及びNKKI 1 10  
 に含まれるベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子 (BD  
 O)、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ遺伝子  
 (cBDH)、及びカタコール 2, 3-オキシゲナー  
 ゼ遺伝子 (C23O) とベンゼンの代謝様式を示す図で  
 ある。

【図2】 NKKI 1-1の制限酵素地図を示す図であ  
 る。

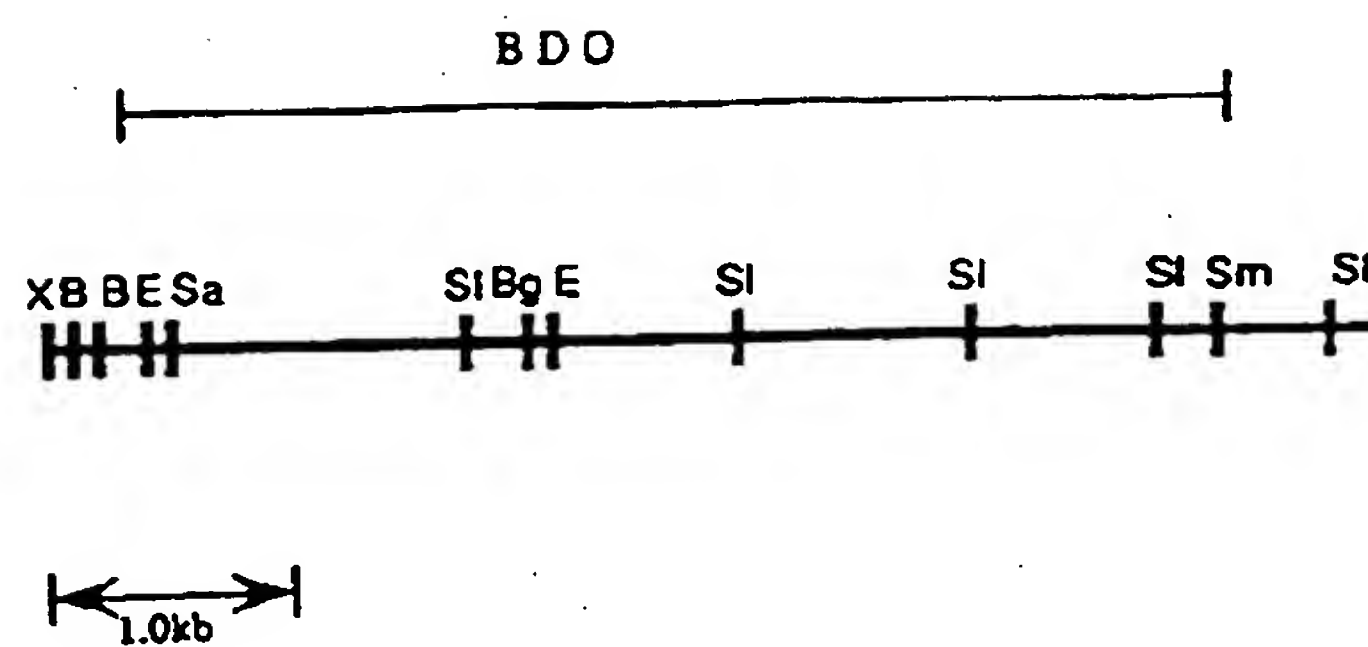
【図3】 ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含むNK  
 KI 1からベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む組み  
 換えプラスミドpBPT8-1を製造する工程を示す図  
 である。

【図1】





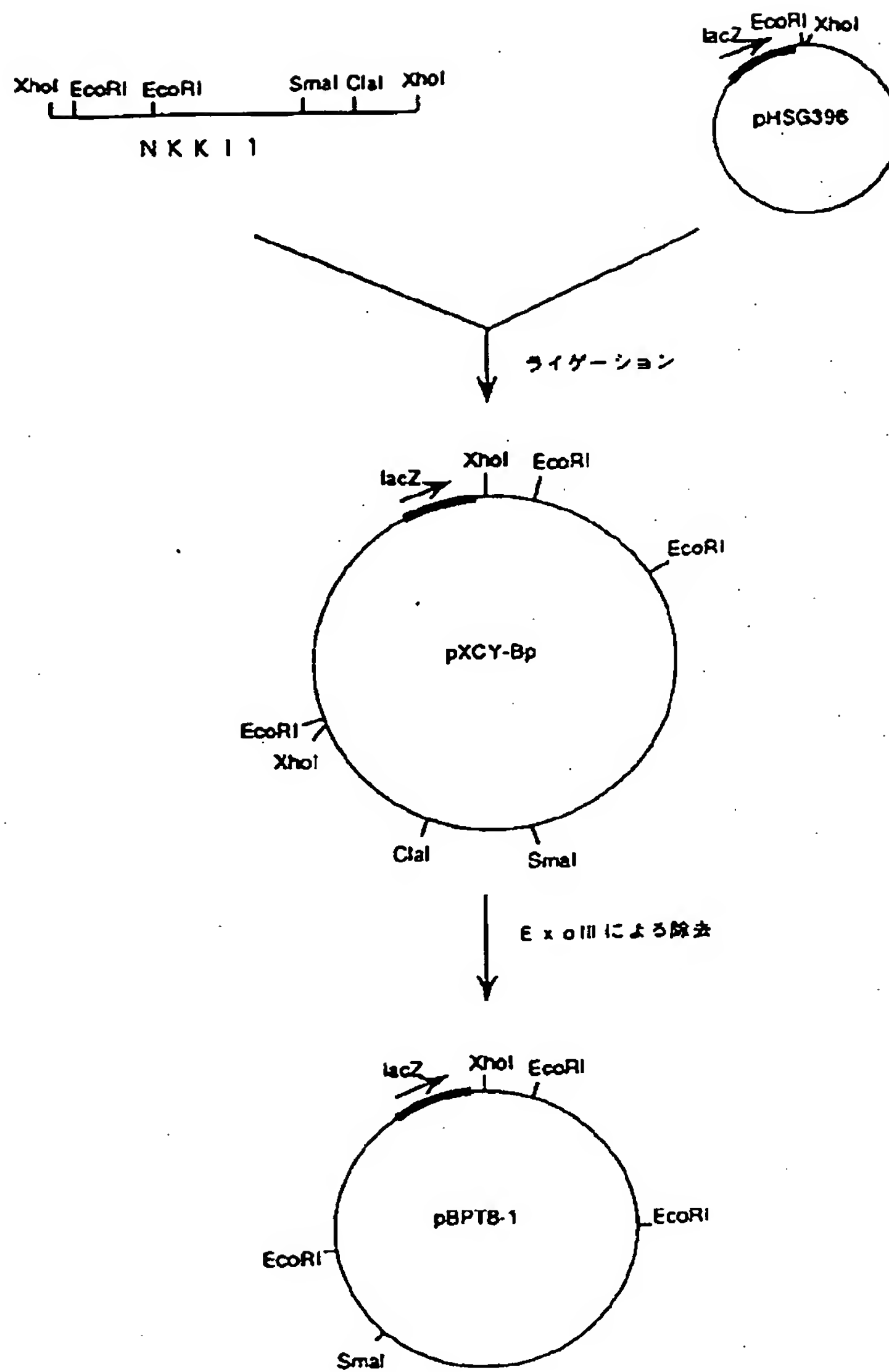
【図2】



B: BamH I; Bg: Bgl II; E: EcoR I; Sa: Sac I;

Sl: Sal I; Sm: Sma I; X: Xho I

【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

(C12N 1/21

C12R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所